1 硫辛酸和敌草快对育肥猪生长性能、血浆和空肠氧化还原状态及空肠细胞凋亡的影响[1]

2 鲍伟光[1] 顾宪红[1,2] 郝 月[2] 崔艳军[2] 王占彬[1*]

3 （1.河南科技大学动物科技学院，洛阳 471003；2.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，动物营养

4 学国家重点实验室，北京 100193）

5 摘 要：本文旨在研究硫辛酸（LA）和敌草快（diquat）对育肥猪生长性能、血浆和空肠氧化还原

6 状态及空肠细胞凋亡的影响。采用 2×2 双因子试验设计，腹腔滴注 diquat（每千克体重 0、8 mg）

7 和饲粮中添加 LA（0、800 mg/kg）为 2 个主效应，共形成 4 个组。选取 24 头体重为(70.64±3.61) kg

8 的健康大白阉公猪，随机分为 4 个组，每组 6 个重复，每个重复 1 头猪。试验期 29 d。于试验第 1

9 天开始在育肥猪饲粮中添加 LA，直到试验结束；于试验第 15 天腹腔滴注 diquat，无 diquat 刺激育

10 肥猪滴注等量的生理盐水。于试验第 29 天收集血浆和空肠样品，用试剂盒检测血浆和空肠组织的

11 抗氧化指标，免疫印迹杂交（Western blotting）试验检测空肠热休克蛋白 70（HSP70）和半胱氨酸

12 天冬氨酸蛋白酶-3（caspase-3）的蛋白质相对表达量。结果表明：1）饲粮添加 LA 和腹腔滴注 diquat

13 对育肥猪的空肠超氧化物歧化酶（SOD）活性有极显著的交互作用（P<0.01），对育肥猪的生长性

14 能、血浆和空肠其他抗氧化指标以及空肠 HSP70 和 caspase-3 的蛋白质相对表达量均无显著交互作

15 用（P>0.05）。2）腹腔滴注 diquat 极显著降低了育肥猪的平均日采食量（ADFI）和平均日增重（ADG），

16 血浆 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和过氧化氢酶（CAT）活性，空肠 SOD、锰超氧化物

17 歧化酶（MnSOD）活性和总抗氧化能力（T-AOC）（P<0.01）；极显著升高了料重比（F/G）、血

18 浆丙二醛（MDA）含量、空肠过氧化氢（H_2O_2）含量、空肠 HSP70 和 caspase-3 的蛋白质相对表达

收稿日期：2016-05-03

基金项目：国家重点基础研究发展计划课题（2012CB124706）；国家科技支撑计划课题（2012BAD39B02）；中国农业科学院科技创新工程（ASTIP-IAS07）

作者简介：鲍伟光（1988—），男，河南开封人，硕士研究生，从事动物营养与应激调控研究。E-mail: baoweiguang2013@163.com

*通信作者：王占彬，教授，博士生导师，E-mail: wangzhanbin3696@126.com

19 量（P<0.01）。饲粮中添加 LA 使育肥猪的 ADFI 显著升高（P<0.05），ADG 极显著升高（P<0.01），
20 空肠 MnSOD 活性极显著升高（P<0.01），空肠 HSP70 的蛋白质相对表达量显著降低（P<0.05），
21 空肠 caspase-3 的蛋白质相对表达量有降低的趋势（P=0.052）。3）在 diquat 刺激下，饲粮中添加
22 LA 使育肥猪的 ADFI 和 ADG 极显著升高（P<0.01），血浆 SOD 活性显著升高（P<0.05），空肠
23 SOD 和 MnSOD 活性极显著升高（P<0.01）。综上所述，腹腔滴注 diquat 引起了育肥猪强烈的氧化
24 应激，导致了育肥猪生长性能下降、血浆和空肠氧化还原系统失衡，并引起空肠细胞凋亡。饲粮中
25 添加 LA 有缓解 diquat 所致的育肥猪氧化应激的作用，并能减缓空肠氧化及细胞凋亡。

26 关键词：硫辛酸；敌草快；育肥猪；氧化应激；空肠；细胞凋亡
27 中图分类号：S828

28 氧化应激是动物机体内氧化还原系统失衡的状态，是导致人类和动物综合病征的主要原因之
29 一。正常情况下，机体内有一系列的适应机制保护细胞免于损伤，多种有害刺激可以打破机体内氧
30 化还原系统的平衡状态，促使细胞凋亡甚至导致病理损伤[1]。敌草快（diquat）为氧化还原型双吡
31 啶除草剂，属中等毒性化合物，进入动物机体后利用分子氧产生氧自由基和其他活性氧（ROS），
32 导致氧化应激[2]。硫辛酸（lipoic acid，LA）作为高效抗氧化剂可以减少 ROS 的产生，减弱 DNA
33 的氧化损伤，抑制脂质过氧化，并能很大程度地改善体内抗氧化防御系统，对氧化应激引起的疾病
34 有显著的缓解作用[3]。氧化应激通过线粒体、死亡受体、内质网应激等途径介导细胞凋亡[4]；也可
35 能通过激活丝裂原活化蛋白激酶通路、活化核转录因子 κB（NF-κB）并诱导其表达、激活半胱氨酸
36 天冬氨酸蛋白酶（caspase）途径诱导细胞凋亡[5]。内源性和外源性通路不一定相互独立，二者的某
37 些构成因素可能对单一刺激引起的凋亡过程具有协同调节作用。肠道作为应激反应的中心器官，在
38 机体遭受应激源刺激时最先出现缺氧缺血的状况[6]。氧化应激可导致肠道上皮细胞正常生长代谢受
39 阻、细胞功能受损，进一步引发炎症反应、肠道大量细胞出现凋亡，最终可导致肠黏膜形态结构受
40 损、肠道通透性升高、肠道免疫机能障碍[7]。Diquat 作为一种氧化应激诱导剂已经分别应用于野生

41 型大鼠[8]、断奶仔猪[9]和生长猪[10]，并成功建立了氧化应激模型。LA 具有双硫五元环结构，有显
42 著的亲电性和与自由基反应能力，在生物体内可以转化为还原型的二氢硫辛酸，并能够再生为内源
43 性抗氧化剂。此外，LA 和二氢硫辛酸能够调节 NF-κB 的激活，且 LA 能够阻止艾滋病病毒（HIV）
44 复制，影响癌基因（*C-fos*）的表达，对自由基代谢过程中的中间产物过氧化氢（H_2O_2）造成的细
45 胞 DNA 氧化损伤具有显著的保护作用[11]。根据氧化损伤理论开发有针对性的饲料添加剂已成为国
46 内外的一个研究热点。然而，近年来的研究多选用小型动物建立氧化应激模型，且有关氧化应激促
47 使细胞凋亡的研究大都限制在细胞水平，而建立大中型动物模型研究氧化应激引起细胞凋亡的试验
48 相对较少，其中将 LA 作为营养素来缓解氧化应激导致细胞凋亡的动物试验更为少见。本试验以育
49 肥猪为研究对象，选用 diquat 诱导育肥猪产生氧化应激，探讨氧化应激对育肥猪生长性能、血浆和
50 空肠氧化还原状态及空肠细胞凋亡的影响；选择 LA 为营养素，旨在探究 LA 对 diquat 诱导的氧化
51 应激育肥猪生长性能、血浆和空肠氧化还原状态及空肠细胞凋亡的调控作用，为 LA 在育肥猪饲粮
52 中作为抗氧化应激剂的合理应用提供参考，并为进一步揭示 LA 缓解空肠氧化及细胞凋亡的机制提
53 供理论依据。

54 ## 1 材料与方法

55 ### 1.1 试验动物与试验设计

56 采用 2×2 双因子试验设计，腹腔滴注 diquat（每千克体重 0、8 mg）和饲粮中添加 LA（0、800
57 mg/kg）为 2 个主效应，共形成 4 个组，分别为-Diquat-LA 组（0 mg/kg diquat+0 mg/kg LA）、-Diquat+LA
58 组（0 mg/kg diquat+800 mg/kg LA）、+Diquat-LA 组（8 mg/kg diquat+0 mg/kg LA）、+Diquat+LA
59 组（8 mg/kg diquat+800 mg/kg LA）。Diquat 购自美国 Sigma 公司；LA 购自美国 Amresco 公司，纯
60 度≥99%。

61 试验选取 24 头体重为(70.64±3.61) kg 的健康大白阉公猪，根据体重相近的原则随机分为 4 个组，
62 每组 6 个重复，每个重复 1 头猪。试验期 29 d。于试验第 1 天开始在-Diquat+LA 组和+Diquat+LA

63 组育肥猪饲粮中添加 800 mg/kg LA，直到试验结束，其他 2 组不添加；于试验第 15 天对+Diquat-LA
64 组和+Diquat+LA 组育肥猪腹腔滴注 diquat，每头育肥猪一次性滴注量为每千克体重 8 mg，以 250 mL
65 生理盐水稀释后采用输液器滴注，其他 2 组育肥猪滴注等量的生理盐水，滴注耗时约 5 min。
66 1.2 试验饲粮与饲养管理
67 参考 NRC（2012）及《猪饲养标准》（NY/T 65-2004）相应阶段营养需要配制玉米–豆粕型基
68 础饲粮（粉料），基础饲粮组成及营养水平见表 1。为了保证饲粮质量，根据育肥猪日采食量估算
69 每周采食总量，并根据配方每周配料 1 次，配料时按照试验设计在基础词粮中分别添加 0、800 mg/kg
70 的 LA 构成 2 种试验饲粮。
71 表 1 基础饲粮组成及营养水平（风干基础）
72 Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	66.20
豆粕 Soybean meal	20.00
小麦麸 Wheat bran	6.50
次粉 Wheat middlings	4.00
石粉 Limestone	1.00
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.60
食盐 NaCl	0.40
预混料 Premix[1)]	1.00
L-赖氨酸盐酸盐 *L*-Lys•HCl	0.30
合计 Total	100.00

营养水平 Nutrient levels[2]	
消化能 DE/(MJ/kg)	13.39
粗蛋白质 CP	15.73
钙 Ca	0.65
总磷 TP	0.41
有效磷 AP	0.17
赖氨酸 Lys	0.92
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.54

73 [1]预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kg of diets：VA 2 512 IU，VD_3 1 200 IU，VE_3 4 IU，

74 VK_3 1.5 mg，VB_{12} 17.6 μg，核黄素 riboflavin 2.5 mg，泛酸 pantothenic acid 6.8 mg，烟酸 nicotinic acid 20.3 mg，胆

75 碱 choline 351 mg，Mn 10 mg，Fe 50 mg，Zn 50 mg，Cu 10 mg，I 0.3 mg，Se 0.3 mg。

76 [2]消化能为计算值，其他营养水平为实测值。DE was a calculated value, while the other nutrient levels were measured

77 values.

78 试验在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所试验基地猪场进行。试验前圈舍彻底清洗，以 2%～

79 3% NaOH 和百毒杀先后 2 次消毒，再密闭熏蒸 24 h（高猛酸钾:甲醛=1:2，*V/V*），通风干燥 5 d，

80 转入育肥猪当天再用百毒杀消毒。转入的育肥猪于 160 cm×90 m×120 cm 的代谢笼中单笼饲养，适

81 应约 1 周后开始正式试验。试验期间由专人对育肥猪进行管理和饲喂，所有操作均严格按照饲养手

82 册进行，尽可能减少与试验无关的应激因素，环境温度控制在 15～20 ℃，相对湿度 40%～60%。

83 1.3 样品采集

84 试验第 29 天，用含肝素钠抗凝剂的采血管采集育肥猪前腔静脉血液，静置 10～15 min 后，3 000

85 r/min 离心 10 min 分离血浆，-20 ℃保存。用电击棒（110 V，5 A）将育肥猪击晕，悬挂颈动脉放

86 血，整个过程在 30 s 内完成以确保将育肥猪的痛苦降到最低。待育肥猪没有角膜反射后，立即沿腹

87 中线剖开，取出内脏，找到空肠中段部位剪取 1～2 cm 空肠段，用预冷的生理盐水冲洗掉食糜后，

88 放入离心管中，液氮速冻，-80 ℃保存。

89 1.4 测定指标及方法

90 1.4.1 生长性能

91 分别在正式试验开始前、腹腔滴注 diquat 前和屠宰前称取育肥猪的体重；试验期间记录每次的

92 投料量和饲槽中的剩料量，以计算每头猪的日采食量。计算育肥猪的平均日增重（average daily gain，

93 ADG）、平均日采食量（average daily feed intake，ADFI）和料重比（F/G）。由于试验第 15 天对

94 +Diquat-LA 组和+Diquat+LA 组育肥猪腹腔滴注 diquat，所以不测定这 2 组 1~14 天的生长性能数据。

95 1.4.2 血浆抗氧化指标

96 血浆中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione

97 peroxidase，GSH-Px）、过氧化氢酶（catalase，CAT）活性及丙二醛（malondialdehyde，MDA）含

98 量均采用比色法测定，试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

99 1.4.3 空肠组织抗氧化指标

100 将空肠组织样品从-80 ℃冰箱取出放入研钵，边倒入液氮边研磨，直至磨成粉末，准确称量粉

101 末重量，并按照 1:9（*m/V*）加入生理盐水制成 10%的组织匀浆；在 4 ℃的低温冷冻离心机中 3 000

102 r/min 离心 15 min，取上清原液备用；将原液用生理盐水稀释成 1%的组织匀浆，用南京建成生物工

103 程研究所提供的考马斯亮蓝试剂盒测定 1%组织匀浆中的蛋白质浓度。组织中 SOD、锰超氧化物歧

104 化酶（MnSOD）活性、总抗氧化能力（T-AOC）以及 H_2O_2 含量用南京建成生物工程研究所提供的

105 试剂盒测定。

106 1.4.4 空肠组织细胞凋亡蛋白表达量

107 免疫印迹杂交（Western blotting）试验检测热休克蛋白 70（HSP70）和半胱氨酸天冬氨酸蛋白

108 酶-3（caspase-3）的蛋白质表达量。取育肥猪空肠组织 100 mg，用组织裂解液裂解后，按照试剂盒

109 （南京建成生物工程研究所）操作说明书提取空肠组织蛋白质；将提取好的空肠组织蛋白质进行十

110 二烷基硫酸钠–聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）（120 V，90 min），电泳结束后以湿转法将蛋

111 白质转印至硝酸纤维素（NC）膜上（350 mA，90 min）；将转印完的 NC 膜完全浸没在 3%牛血清

112 白蛋白–Tris 缓冲生理盐水和吐温 20（BSA-TBST）中室温轻摇 30 min；用 3% BSA-TBST 稀释一抗

113 （HSP70 鼠单抗，TDY 062，1：2000；caspase-3 兔多抗，TDY 411，1：2000），室温孵育 10 min，

114 4 ℃过夜；第二天从 4 ℃拿出膜，室温孵育 30 min；Tris 缓冲生理盐水和吐温 20（TBST）洗膜 5

115 次，每次 3 min；用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释二抗[辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG（H+L）HRP，

116 1：10000]，室温轻摇 40 min；TBST 洗膜 6 次，每次 3 min；增强化学发光（ECL）试剂加到膜上

117 后反应 3～5 min，曝光 10 s～5 min（曝光时间随不同光强度而调整），显影 2 min，定影；采用 Image

118 Master Total Lab V 1.10 图像分析软件对图像进行灰度分析，分别以 HSP70/磷酸甘油醛脱氢酶

119 （GAPDH）、caspase-3/GAPDH 表示 HSP70、caspase-3 的蛋白质相对表达量。

120 1.5 数据处理与分析

121 采用 SAS 9.2 软件对数据进行两因素有互作的方差分析，并分别在 diquat（有、无）刺激下，

122 对添加 LA 组和未添加 LA 组进行 t 检验，所有数据均采用“平均值±标准差”表示，P<0.05 为差异

123 显著，P<0.01 为差异极显著。

124 2 结果与分析

125 2.1 LA 和 diquat 对育肥猪生长性能的影响

126 由表 2 可知，饲粮中添加 LA 和腹腔滴注 diquat 对育肥猪的 ADFI、ADG 和 F/G 均无显著交互

127 作用（P>0.05）。试验 1～14 d，饲粮中添加 LA 对育肥猪的 ADFI、ADG 和 F/G 影响均无显著差

128 异（P>0.05）。试验 15～28 d，腹腔滴注 diquat 对育肥猪的 ADFI、ADG 和 F/G 均有极显著的影响

129 （P<0.01），使育肥猪的 ADFI（3 093.5 g/d vs. 2 238.5 g/d，-27.64%）和 ADG（1 080.5 g/d vs. 562.5

130 g/d，-47.94%）降低、F/G 升高（2.895 vs. 4.065，+40.41%）；饲粮中添加 LA 使 ADFI 显著升高（2

131 451 g/d vs. 2 881 g/d，+17.54%；*P*<0.05）、ADG 极显著升高（765.5 g/d vs. 877.5 g/d，+14.63%；

132 *P*<0.01），但 F/G 未发生显著变化（*P*>0.05）。与+Diquat-LA 组相比，+Diquat+LA 组育肥猪的 ADFI

133 （1 900 g/d vs. 2 577 g/d，+35.63%）和 ADG（477 g/d vs. 648 g/d，+35.85%）极显著升高（*P*<0.01）；

134 -Diquat-LA 组与-Diquat+LA 组育肥猪的生长性能指标无显著差异（*P*>0.05）。这表明饲粮中添加

135 LA 缓解了 diquat 引起的育肥猪 ADFI 和 ADG 的下降，而在无 diquat 刺激时饲粮中添加 LA 对育肥

136 猪生长性能的影响较小。

137 表 2 LA 和 diquat 对育肥猪生长性能的影响

138 Table 2 Effects of LA and diquat on growth performance of finishing pigs

139

项目 Items	组别 Groups				*P* 值 *P*-value		
	-Diquat-LA 组 -Diquat-LA group	-Diquat+LA 组 –Diquat+LA group	+Diquat-LA 组 +Diquat-LA group	+Diquat+LA 组 +Diquat+LA group	敌草快 Diquat	硫辛酸 LA	敌草快×硫辛酸 Diquat×LA
1～14 天 1 to 14 days（*n*=12）							
平均日采食量 ADFI/(g/d)	2 836±537	2 832±431	-	-	-	0.99	-
平均日增重 ADG/(g/d）	1 005±141	1 085±110	-	-	-	0.17	-
料重比 F/G	2.84±0.56	2.62±0.37	-	-	-	0.27	-
15～28 天 15 to 28 days							

（n=6）

平均日采食量 ADFI/(g/d)	3 002±254	3 185±334	1 900±491^{B}	2 577±675^{A}	<0.01	0.04	0.20
平均日增重 ADG/(g/d)	1 054±189	1 107±78	477±99^{B}	648±67^{A}	<0.01	<0.01	0.13
料重比 F/G	2.91±0.46	2.88±0.31	4.05±1.02	4.08±1.26	<0.01	0.99	0.92

140 同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），不同大写字母表示差异极显著（P<0.01），

141 相同小写字母或无字母表示差异不显著（P>0.05）。下表同。

142 In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05),

143 and with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01), while with the same

144 letter or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). The same as below.

145 2.2 LA 和 diquat 对育肥猪血浆抗氧化指标的影响

146 由表 3 可知，饲粮中添加 LA 和腹腔滴注 diquat 对育肥猪血浆抗氧化指标均无显著交互作用

147 （P>0.05）。腹腔滴注 diquat 使育肥猪血浆 SOD（39.73 U/mL vs. 22.50 U/mL，-43.37%）、GSH-Px

148 （597.85 U/mL vs. 461.78 U/mL，-22.76%）和 CAT 活性（11.59 U/mL vs. 5.86 U/mL，-49.44%）极

149 显著降低（P<0.01），血浆 MDA 含量（1.855 nmol/mL vs. 2.81 nmol/mL，+51.48%）极显著升高

150 （P<0.01）。饲粮中添加 LA 对育肥猪血浆 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性及 MDA 含量均无显著影响

151 （P>0.05）。与+Diquat-LA 组相比，+Diquat+LA 组育肥猪血浆 SOD 活性（20.87 U/mL vs. 24.13 U/mL，

152 +15.62%）显著提高（P<0.05）；-Diquat-LA 组与-Diquat+LA 组育肥猪血浆抗氧化指标无显著差异

153 （P>0.05）。这表明饲粮中添加 LA 缓解了 diquat 引起的育肥猪血浆 SOD 活性的下降，一定程度

154 上改善了氧化应激下育肥猪血浆的氧化还原状态；而在无 diquat 刺激时，饲粮中添加 LA 对育肥猪

155 血浆氧化还原状态的作用较小。

156 表 3 LA 和 diquat 对育肥猪血浆抗氧化指标的影响

157 Table 3 Effects of LA and diquat on plasma antioxidative indices of finishing pigs

项目 Items	组别 Groups				*P* 值 *P*-value		
	-Diquat-LA 组 -Diquat-LA group	-Diquat+LA 组 –Diquat+LA group	+Diquat-LA 组 +Diquat-LA group	+Diquat+LA 组 +Diquat+LA group	敌草快 Diquat	硫辛酸 LA	敌草快×硫辛酸 Diquat×LA
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mL)	39.50±3.74	39.96±3.06	20.87±2.67[b]	24.13±2.08[a]	<0.01	0.08	0.18
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mL)	594.52±10.45	601.18±14.55	453.67±34.57	469.89±40.10	<0.01	0.36	0.70
过氧化氢酶 CAT/(U/mL)	11.23±1.67	11.95±2.60	6.05±0.82	5.67±1.62	<0.01	0.78	0.39
丙二醛 MDA/(nmol/L)	1.82±0.39	1.89±0.60	2.91±0.18	2.71±0.55	<0.01	0.74	0.45

158 2.3 LA 和 diquat 对育肥猪空肠抗氧化指标的影响

159 由表 4 可知，饲粮中添加 LA 和腹腔滴注 diquat 对育肥猪空肠 SOD 活性有极显著的交互作用
160 （P<0.01），对空肠 MnSOD 活性、T-AOC 和 H_2O_2 含量无显著的交互作用（P>0.05）。腹腔滴注
161 diquat 使育肥猪空肠 SOD（183.20 mg/g prot vs. 131.45 mg/g prot，-28.25%）、MnSOD 活性（40.76
162 mg/g prot vs. 26.22 mg/g prot，-35.67%）和 T-AOC（2.53 mg/g prot vs. 1.61 mg/g prot，-36.24%）极

163 显著降低（P<0.01），H_2O_2 含量（3.47 mmol/g prot vs. 4.87 mmol/g prot，+40.55%）极显著升高

164 （P<0.01）。饲粮中添加LA使育肥猪空肠MnSOD活性（31.74 mg/g prot vs. 35.24 mg/g prot，+11.01%）

165 极显著升高（P<0.01），对空肠SOD活性、T-AOC和 H_2O_2 含量均无显著影响（P>0.05）。与+Diquat-LA

166 组相比，+Diquat+LA组育肥猪空肠SOD（120.39 mg/g prot vs. 142.50 mg/g prot，+18.37%）和MnSOD

167 （23.42 mg/g prot vs. 29.01 mg/g prot，+23.87%）活性极显著提高（P<0.01），-Diquat-LA 组与

168 -Diquat+LA组育肥猪空肠抗氧化指标无显著差异（P>0.05）。这表明饲粮中添加LA缓解了diquat

169 引起的育肥猪空肠SOD和MnSOD活性的下降，一定程度上改善了氧化应激下育肥猪空肠氧化还

170 原状态；而在无diquat刺激时，饲粮中添加LA对育肥猪空肠氧化还原状态的作用较小。

171 表4 LA和diquat对育肥猪空肠抗氧化指标的影响

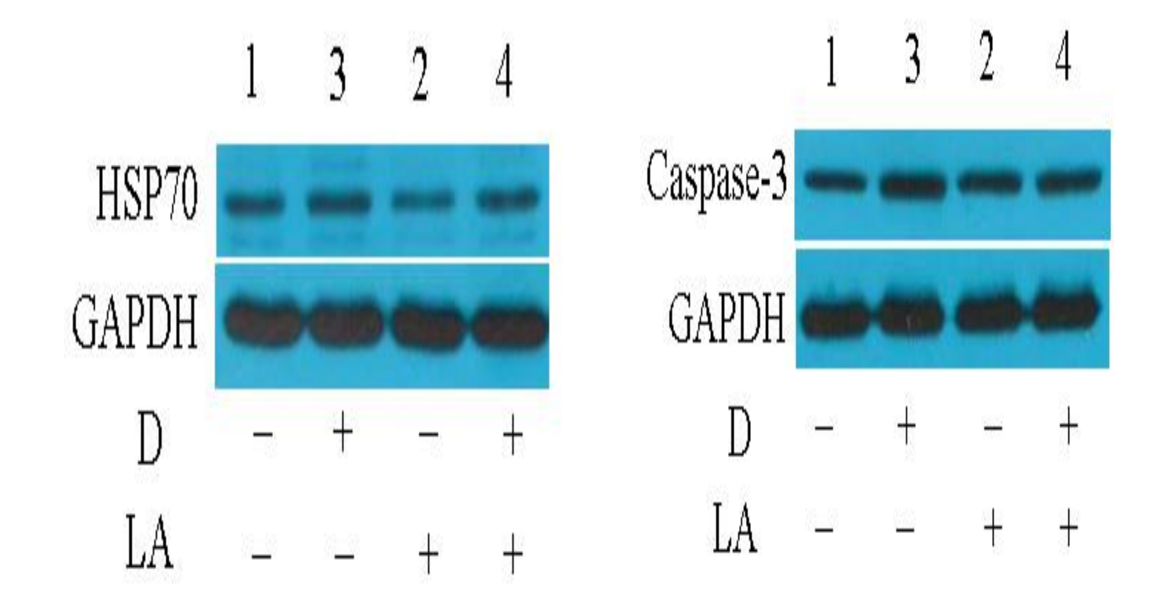
172 Table 4 Effects of LA and diquat on jejunum antioxidative indices of finishing pigs

项目 Items	组别 Groups				*P* 值 *P*-value		
	-Diquat-LA 组 -Diquat-LA group	-Diquat+LA 组 –Diquat+LA group	+Diquat-LA 组 +Diquat-LA group	+Diquat+LA 组 +Diquat+LA group	敌草快 Diquat	硫辛酸 LA	敌草快×硫辛酸 Diquat×LA
超氧化物歧化酶 SOD/(mg/g prot)	186.99±10.70	179.41±17.04	120.39±12.22^{B}	142.50±15.97^{A}	<0.01	0.15	<0.01
锰超氧化物歧化酶 MnSOD /(mg/g prot)	40.06±3.01	41.46±3.78	23.42±1.89^{B}	29.01±2.21^{A}	<0.01	<0.01	0.06

总抗氧化能力 T-AOC/(mg/g prot)	2.60±0.25	2.45±0.10	1.60±0.09	1.62±0.27	<0.01	0.39	0.31
过氧化氢 H_2O_2/(mmol/g prot)	3.56±0.37	3.37±0.34	4.99±0.45	4.75±0.36	<0.01	0.08	0.81

173 2.4 LA 和 diquat 对育肥猪空肠细胞凋亡蛋白表达的影响

174 由图 1 可知，腹腔滴注 diquat 使育肥猪空肠 HSP70 和 caspase-3 的蛋白质相对表达量升高，饲
175 粮中添加 LA 使育肥猪空肠 HSP70 和 caspase-3 的蛋白质相对表达量降低。由表 5 可知，饲粮中添
176 加 LA 和腹腔滴注 diquat 对育肥猪空肠 HSP70 和 caspase-3 的蛋白质相对表达量均无显著的交互作
177 用（P>0.05）；腹腔滴注 diquat 使育肥猪空肠 HSP70（0.555 vs. 0.830，+49.55%）和 caspase-3（0.425
178 vs. 0.760，+78.82%）蛋白质相对表达量极显著升高（P<0.01），饲粮中添加 LA 使 HSP70（0.710 vs.
179 0.675，-4.93%；P<0.05）、caspase-3（0.615 vs. 0.570，-7.32%；P=0.052）的蛋白质相对表达量降
180 低。这表明无论育肥猪是否处于应激状态，饲粮中添加 LA 都能在一定程度上抑制空肠细胞的凋亡。



HSP70：热休克蛋白 70；Caspase-3：半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3；GAPDH：磷酸甘油醛脱氢酶；LA：硫辛酸 lipoic acid；D：敌草快 qiquat；＋：添加或滴注 supplementation or injection；－：不添加或不滴注 no supplementation or no injection）

图 1 空肠 HSP70 和 Caspase-3 的蛋白质相对表达量

Fig.1 Protein relative expression levels of HSP70 and caspase-3 in jejunum

181 表 5 LA 和 diquat 对育肥猪空肠 HSP70 和 Caspase-3 的蛋白质相对表达量的影响

182 Table 5 Effects of LA and diquat on protein relative expression levels of HSP70 and caspase-3 in

183 jejunum of finishing pigs

项目 Items	组别 Groups				*P* 值 *P* value		
	-Diquat-LA 组 -Diquat-LA group	-Diquat+LA 组 –Diquat+LA	+Diquat-LA 组 +Diquat-LA	+Diquat+LA 组 +Diquat+LA	敌草快 Diquat	硫辛酸 LA	敌草快×硫辛酸

		group	group	group			D×LA
热休克蛋白 70 HSP70	0.57±0.05	0.54±0.02	0.85±0.01	0.81±0.01	<0.01	0.030	0.73
半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 Caspase-3	0.44±0.09	0.41±0.02	0.79±0.04	0.73±0.01	<0.01	0.052	0.52

184 3 讨 论

185 参考李丽娟[9]每千克体重腹腔注射 12 mg diquat 诱导了断奶仔猪产生氧化应激；徐静等[10]每千

186 克体重一次性腹腔注射 8 mg diquat 溶液可诱导生长猪产生氧化应激，且氧化应激效应可持续 28 d 。

187 本试验每千克体重腹腔滴注 8 mg diquat，所有育肥猪均出现急躁、空口咀嚼、呕吐、厌食等现象，

188 持续一周左右后采食量逐渐恢复；非应激组滴注等量的生理盐水未见猪只行为异常。这与前人的研

189 究结果[9-10,12-14]相似，而本研究选择育肥猪作为试验动物为建立大中型氧化应激动物模型奠定了基

190 础。虽然 LA 缓解 diquat 导致的氧化应激的研究尚未见报道，但有研究表明 LA 可以用于治疗百草

191 枯（paraquat）引起的大鼠中毒[15]，而 paraquat 作为一种有机杂环类接触性除草剂与 diquat 的结构

192 和功能相似。

193 3.1 LA 和 diquat 对育肥猪生长性能及抗氧化指标的影响

194 本试验结果显示，在 diquat 诱导的氧化应激状态下，育肥猪的 ADFI 和 ADG 极显著降低，F/G

195 极显著升高，说明 diquat 诱导的氧化应激对育肥猪产生了较大的副作用，并导致育肥猪的生长性能

196 降低，这一结果与 Zheng 等[12]、Lv 等[13]、赵娇等[14]在断奶仔猪上的研究结果相似，说明本试验构

197 建的育肥猪氧化应激模型成功。此外，饲粮中添加 LA 使育肥猪的 ADFI 显著升高、ADG 极显著升

198 高，特别是在应激状态下，LA 对 ADFI 和 ADG 的改善作用尤为显著，表明饲粮中添加 LA 对育肥

199 猪的氧化应激有一定的缓解作用，而具体的作用机理还需进一步的研究。

200 Diquat 的作用是夺取分子氧的电子，使分子氧转变为 ROS 进而造成氧化应激；LA 具有双硫五

201 元环结构，具有显著的亲电性和与自由基反应的能力，可以减少 ROS 的产生。Diquat 进入机体后，

202 ROS 水平剧增，大量消耗 SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶类，导致机体氧化还原系统严重失衡。
203 徐静等[10]研究表明，diquat 极显著降低了生长猪第 7、14、21 和 28 天血清 GSH-Px 和 SOD 活性，
204 显著提高了血清 MDA 含量，第 7、14、21 和 28 天血清 CAT 活性有降低趋势。本试验结果显示，
205 应激组育肥猪血浆 SOD、GSH-Px、CAT 活性均极显著低于非应激组，MDA 含量极显著高于非应
206 激组；且在应激状态下，饲粮中添加 LA 组血浆 SOD 活性显著高于未添加 LA 组，表明 diquat 诱导
207 了育肥猪的氧化应激，而 LA 能通过清除体内过量的 ROS 来缓解机体的氧化应激。
208 肠道极易受氧化损伤[16]，腹腔滴注的 diquat 进入机体后首先要通过肠黏膜，肠黏膜氧化应激产
209 生的过量的氧自由基可以破坏 DNA、生物脂质大分子、蛋白质和其他生物大分子；过量的氧自由
210 基也可以通过抗氧化系统（包括非酶成分和抗氧化酶系[17-18]）被消除。在肠道内环境中，单个氧化
211 还原体系分别独立存在于线粒体、细胞核和内质网等细胞器中，任何一个氧化还原体系被破坏都会
212 导致肠道黏膜的氧化应激[19]，进而导致肠道病变。宋小珍[20]在断奶仔猪上的研究表明，氧化应激使
213 猪肠道 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低，MDA 含量显著上升。Chen 等[21]研究表明，小肠上皮细胞
214 添加谷胱甘肽（GSH）后使细胞液中 SOD 和 CAT 的活性有一定程度的提高，原因可能是 GSH 清
215 除了部分自由基，使得自由基钝化抗氧化酶的能力减弱。上述试验表明，氧化应激导致了抗氧化酶
216 活性的降低，而添加营养素能够一定程度地提高抗氧化酶的活性。本试验结果显示，应激组育肥猪
217 空肠 SOD 和 MnSOD 活性以及 T-AOC 均极显著低于非应激组，空肠 H_2O_2 含量极显著高于非应激
218 组；且在氧化应激情况下，饲粮中添加 LA 使空肠 MnSOD 活性极显著升高。SOD 包括铜锌超氧化
219 物歧化酶（CuZn-SOD）和 MnSOD 2 种分型，其中 MnSOD 为线粒体中清除自由基的抗氧化物酶，
220 表明本试验 diquat 诱导的氧化应激可能导致了细胞器的损伤。LA 的特殊化学结构使其同时具有水
221 溶性和脂溶性，易于透过细胞膜深入细胞器中发挥作用；LA 的特殊化学结构还决定了 LA 具有清
222 除机体过量的自由基、抑制脂质过氧化和减弱 DNA 的氧化损伤等功能[22]。因此，饲粮中添加 LA
223 能在很大程度上改善体内抗氧化防御系统，进而推测 LA 可能是通过维持细胞器中氧化还原体系的

224 平衡来修复空肠氧化，但其修复机理尚不明确。

225 3.2 LA 和 diquat 对育肥猪空肠细胞凋亡的影响

226 在机体遭受氧化应激的情况下，ROS 能通过激活一系列信号通路来诱导细胞凋亡[23]。研究表

227 明，线粒体接受凋亡信号释放细胞色素 C，细胞色素 C 受 B 细胞淋巴瘤/白血病-2（Bcl-2）家族蛋

228 白的调控参与死亡受体通路，活化特定的 caspase-3 蛋白质，诱导细胞凋亡[24]；当 toll 样受体 4(TLR4)

229 与特异性配体脂多糖（LPS）结合后，激活 NF-κB 途径[25]，NF-κB 可促进 Bcl-2 家族中凋亡因子的

230 表达、增加线粒体膜的通透性、促进细胞色素 C 的释放，进而导致细胞凋亡；NF-κB 也可刺激白细

231 胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α（*TNF-α*）基因的表达，导致 *caspase*-3 高表达，进而引发细胞凋亡[26]。

232 研究表明，无论是通过哪种途径，最终都会激活 caspase-3 前体物进而导致细胞凋亡[5]。本试验结果

233 显示，腹腔滴注 diquat 的育肥猪空肠 caspase-3 蛋白质相对表达量极显著高于无 diquat 刺激的育肥

234 猪，由此推测，氧化应激可能导致了育肥猪空肠细胞凋亡，但具体是通过哪种途径还需要进一步探

235 究。

236 热休克蛋白（HSPs）在细胞生长调控和凋亡中发挥着重要作用，有关 HSPs 与细胞凋亡信号转

237 导途径调节机制的研究发现，HSPs 能够在 Fas 死亡受体途径[27]、c-Jun 氨基末端激酶（JNK）/应激

238 活化蛋白激酶（SAPK）途径[28]和 caspase 途径[29]等发挥调节作用，并且部分依赖于 HSPs 的“分子

239 伴侣”功能，控制着细胞生命进程。由于 HSP70 分子的 C 端含有高度保守的核酸序列，此序列的缺

240 失或突变会导致其结合底物能力的丧失，因此，推测该序列或许与 HSP70 对 caspase-3 的抑制作用

241 有关。然而有研究表明，低浓度和高浓度的 H_2O_2 可分别诱导 caspase 依赖性和非依赖性的细胞凋亡，

242 HSP70 对 2 类凋亡都具有抑制作用[30]。本试验结果显示，diquat 诱导的氧化应激使 HSP70 的蛋白

243 质相对表达量急剧升高，而 caspase-3 的蛋白质相对表达量没有随着 HSP70 的蛋白质相对表达量的

244 升高而有所降低，说明 HSP70 可能作用于凋亡过程早期阶段，而 caspase-3 是否参与了 HSP70 对凋

245 亡的调节则值得商榷。

246 有研究表明，LA 能够调节 NF-κB 的激活，并阻止 HIV 复制，从而影响 *C-fos* 的表达[11]。Bojunga
247 等[31]报道，应用 LA 干预可以抑制细胞凋亡，下调 caspase 的活性，增加凋亡保护因子 *Bcl*-2 的表达，
248 起到保护机体的作用。本试验结果显示，饲粮中添加 LA 对 HSP70 和 caspase-3 蛋白质相对表达量
249 均有抑制作用，特别是在 diquat 诱导的氧化应激情况下，其作用更为显著，可能是 LA 通过清除体
250 内过量的自由基进而缓解了应激，导致 HSP70 的蛋白质表达量有所降低；LA 调节 NF-κB 的激活，
251 抑制了 caspase-3 途径，进而阻止了育肥猪空肠细胞的凋亡。

252 4 结 论

253 腹腔滴注 diquat 降低了育肥猪的生长性能，破坏了血浆和空肠的氧化还原状态，并引起空肠细
254 胞凋亡。Diquat 诱导发生氧化应激后，在饲粮中添加 LA 能够提高育肥猪的生长性能，改善血浆和
255 空肠的氧化还原状态，并能在一定程度上减缓空肠细胞凋亡。

256 参考文献：

257 [1] MIYAMOTO H,DOITA M,NISHIDA K,et al.Effects of cyclic mechanical stress on the production of
258 inflammatory agents by nucleus pulposus and anulus fibrosus derived cells *in*
259 *vitro*[J].Spine,2006,31(1):4–9.
260 [2] YAMAUCHI M,NAKANO H,MAEKAWA J,et al.Oxidative stress in obstructive sleep
261 apnea[J].Chest,2005,127(5):1674–1679.
262 [3] SAVITHA S,SIVARAJAN K,HARIPRIYA D,et al.Efficacy of levo carnitine and alpha lipoic acid in
263 ameliorating the decline in mitochondrial enzymes during aging[J].Clinical
264 Nutrition,2005,24(5):794–800.
265 [4] SIMS N R,MUYDERMAN H.Mitochondria,oxidative metabolism and cell death in
266 stroke[J].Biochimica et Biophysica Acta：Molecular Basis of Disease,2010,1802(1):80–91.
267 [5] QIN Y M,AUH S,BLOKH L,et al.TNF-α induces transient resistance to Fas-induced apoptosis in

268 eosinophilic acute myeloid leukemia cells[J].Cellular & Molecular Immunology,2007,4(1):43–52.

269 [6] 代雪立,肖敏华,宋晓琳,等.热应激对家禽肠道结构与功能影响的研究进展[J].中国家

270 禽,2010,32(11):41–43.

271 [7] 张志浩.氧化应激对肉鸡肠道黏膜屏障功能的影响以及缓解肠道氧化损伤物质的研究[D].硕士

272 学位论文.泰安:山东农业大学,2014.

273 [8] FU Y X,CHENG W H,ROSS D A,et al.Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal

274 oxidative stress induced by various doses of diquat[J].Proceedings of the Society for Experimental

275 Biology and Medicine,1999,222(2):164–169.

276 [9] 李丽娟.氧化应激对仔猪肠细胞葡萄糖转运能力及转运载体表达量的影响[D].硕士学位论文.雅

277 安:四川农业大学,2007.

278 [10] 徐静,余冰,陈代文.Diquat 诱导的生长猪氧化应激持续时间及适宜的应激标识[J].中国农业科

279 学,2008,41(12):4359–4364.

280 [11] MORINI M,ROCCATAGLIATA L,DELL’EVA R,et al.α-lipoic acid is effective in prevention and

281 treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis[J].Journal of

282 Neuroimmunology,2004,148(1/2):146–153.

283 [12] ZHENG P,YU B,HE J,et al.Protective effects of dietary arginine supplementation against oxidative

284 stress in weaned piglets[J].British Journal of Nutrition,2013,109(12):2253–2260.

285 [13] LV M,YU B,MAO X B,et al.Responses of growth performance and tryptophan metabolism to

286 oxidative stress induced by diquat in weaned pigs[J].Animal:an International Journal of Animal

287 Bioscience,2012,6(6):928–934.

288 [14] 赵娇,周招洪,梁小芳,等.葡萄籽原花青素及维生素 E 对氧化应激仔猪生长性能、血清氧化还原

289 状态和肝脏氧化损伤的影响[J].中国农业科学,2013,46(19):4157–4164.

290 [15] 杜斌,陈炜,陈俊良,等.α-硫辛酸对百草枯中毒大鼠胸腺 *Bax*、*Bcl*-2 表达及 SOD 活力、MDA 水
291 平的影响[J].中国医院药学杂志,2015,35(23):2071–2074.
292 [16] 蔡旋,王静娴,陈小连,等.肠道上皮氧化应激细胞模型的研究进展[J].畜牧兽医学
293 报,2014,45(3):337–346.
294 [17] LANGIE S A,WILMS L C,HÄMÄLÄINEN S,et al.Modulation of nucleotide excision repair in
295 human lymphocytes by genetic and dietary factors[J].British Journal of
296 Nutrition,2010,103(4):490–501.
297 [18] NEUBAUER O,REICHHOLD S,NICS L,et al.Antioxidant responses to an acute ultra-endurance
298 exercise:impact on DNA stability and indications for an increased need for nutritive antioxidants in
299 the early recovery phase[J].British Journal of Nutrition,2010,104(8):1129–1138.
300 [19] 周宗灿.氧化还原信号和氧化应激/还原应激[J].毒理学杂志,2015,29(1):1–14.
301 [20] 宋小珍.藿香、苍术提取物复合制剂对高温应激猪小肠消化吸收的影响[D].博士学位论文.南京:
302 南京农业大学,2008.
303 [21] CHEN Q,LE G W,SHI Y H,et al.Effect of iron supplementation on intestinal function and oxidative
304 stress in piglets with induced colitis[J].Journal of Animal and Feed Sciences,2007,16(2):205–213.
305 [22] GORĄCA A,HUK-KOLEGA H,PIECHOTA A,et al.Lipoic acid-biological activity and therapeutic
306 potential[J].Pharmacological Reports,2011,63(4):849–858.
307 [23] 李敏,林俊.细胞凋亡途径及其机制[J].国际妇产科学杂志,2014,41(2):103–107.
308 [24] SINHA K,DAS J,PAL P B,et al.Oxidative stress:the mitochondria-dependent and
309 mitochondria-independent pathways of apoptosis[J].Archives of Toxicology,2013,87(7):1157–1180.
310 [25] BUBICI C,PAPA S,PHAM C G,et al.NF-κB and JNK:an intricate affair[J].Cell
311 Cycle,2004,3(12):1524–1529.

312 [26] FILOMENI G,AQUILANO K,ROTILIO G,et al.Antiapoptotic response to induced GSH
313 depletion:involvement of heat shock proteins and NF-κB activation[J].Antioxidants & Redox
314 Signaling,2005,7(3/4):446–455.
315 [27] CREAGH E M,COTTER T G.Selective protection by hsp70 against cytotoxic drug-,but not
316 Fas-induced T-cell apoptosis[J].Immunology,1999,97(1):36–44.
317 [28] KITAMURA C,OGAWA Y,NISHIHARA T,et al.Transient co-localization of c-Jun N-terminal
318 kinase and c-Jun with heat shock protein 70 in pulp cells during apoptosis[J].Journal of Dental
319 Research,2003,82(2):91–95.
320 [29] BRATTON S B,MACFARLANE M,CAIN K,et al.Protein complexes activate distinct caspase
321 cascades in death receptor and stress-induced apoptosis[J].Experimental Cell
322 Research,2000,256(1):27–33.
323 [30] CREAGH E M,CARMODY R J,COTTER T G.Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent
324 and-independent apoptosis in Jurkat T cells[J].Experimental Cell Research,2000,257(1):58–66.
325 [31] BOJUNGA J,NOWAK D,MITROU P S,et al.Antioxidative treatment prevents activation of
326 death-receptor-and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic
327 rats[J].Diabetoloqia,2004,47(12):2072–2080.

328 Effects of Lipoic Acid and Diquat on Growth Performance, Redox Status of Plasma and Jejunum and Cell
329 Apoptosis of Jejunum of Finishing Pigs

330 BAO Weiguang[1] GU Xianhong[1,2] HAO Yue[2] CUI Yanjun[2] WANG Zhanbin[1*]

331 (1. *College of Animal Science and Technology*, *Henan University of Science and Technology*, *Luoyang*

*Corresponding author, professor, E-mail: wangzhanbin3696@126.com (责任编辑 李慧英)

332 471003, *China*; 2. *State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese*
333 *Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*)

334 Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of lipoic acid (LA) and diquat on growth
335 performance, redox status of plasma and jejunum and cell apoptosis of jejunum of finishing pigs.
336 According to 2×2 double - factor test design, intraperitoneal injection of diquat (0 or 8 mg per kg body
337 weight) and dietary LA (0 or 800 mg/kg) as the two main factors, and 4 groups were formed. Twenty-four
338 healthy Large white castrates with the body weight of (70.64±3.61) kg were randomly allocated to 4
339 groups with 6 replicates per group and 1 pig per replicate. The trial period lasted for 29 days. LA were
340 added in diets all in the trial. Intraperitoneal injection of diquat at day 15 and non-challenged pigs were
341 injected intraperitoneally with the equal amount of physiological saline. Plasma and jejunum samples
342 were collected at day 29 for determination of antioxidative indices using kits. Western blotting assays was
343 conducted for determination of jejunum heat shock protein 70 (HSP70) and caspase-3 protein relative
344 expression levels. The results showed as follows: 1) there was a significant interaction of dietary LA and
345 intraperitoneal injection of diquat on jejunum superoxide dismutase (SOD) activity of finishing pigs
346 (P<0.01), and no significant interactions on growth performance, other antioxidant indices of plasma and
347 jejunum and protein relative expression levels of HSP70 and caspase-3 of jejunum of finishing pigs were
348 found (P>0.05). 2) Intraperitoneal injection of diquat significantly decreased average daily feed intake
349 (ADFI) and average daily gain (ADG), the activities of SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px) and
350 catalase (CAT) of plasma, the activities of SOD and manganese superoxide dismutase (MnSOD) and total
351 antioxidant capacity (T-AOC) of jejunum of finishing pigs (P<0.01); and significantly increased the ratio
352 of feed to gain (F/G), the contents of malondialdehyde (MDA) of plasma and hydrogen peroxide (H_2O_2)
353 of jejunum and protein relative expression levels of HSP70 and caspase-3 of jejunum of finishing pigs

354 (P<0.01). Dietary LA significantly increased ADFI (P<0.05), ADG (P<0.01) and the activity of MnSOD
355 of jejunum (P<0.01), and significantly decreased protein relative expression level of HSP70 of jejunum of
356 finishing pigs (P<0.05), but had a tendency to decrease protein relative expression level of caspase-3
357 (P=0.052). 3) Dietary LA significantly increased ADFI and ADG (P<0.01), the activities of SOD of
358 plasma (P<0.05) and SOD and MnSOD of jejunum (P<0.01) of finishing pigs challenged with diquat. In
359 conclusion, intraperitoneal injection of diquat causes strong oxidative stress of finishing pigs, leads to the
360 reduction of growth performance, imbalance of redox system of plasma and jejunum and cell apoptosis of
361 jejunum. Dietary LA can suppress the oxidative stress caused by intraperitoneal injection of diquat, and
362 may alleviate jejunum oxidation and apoptosis.

363 Key words: lipoic acid; diquat; finishing pigs; oxidative stress; jejunum; apoptosis

364